



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

---

Název: **METODY SEPARACE PEPTIDŮ A ODBĚR REÁLNÝCH VZORKŮ**

Vypracovala: **Zuzana Lacková**

Datum: **7. 2. 2014**

# ODBĚR-PŘEDÁNÍ VZORKŮ

## MĚLI BYCHOM ZNÁT:

- informace, které má analýza poskytnout (př. AMK)
- analyty a jejich předpokládané obsahy (koncentrace)
- další složky materiálu a jejich obsahy (obsah proteinu)
- požadavky a parametry analytické metody (způsob úpravy vzorku, přesnost)
- skupenství vzorku (u tuhých vzorků velikost částic, mechanické vlastnosti) a stabilita vzorku

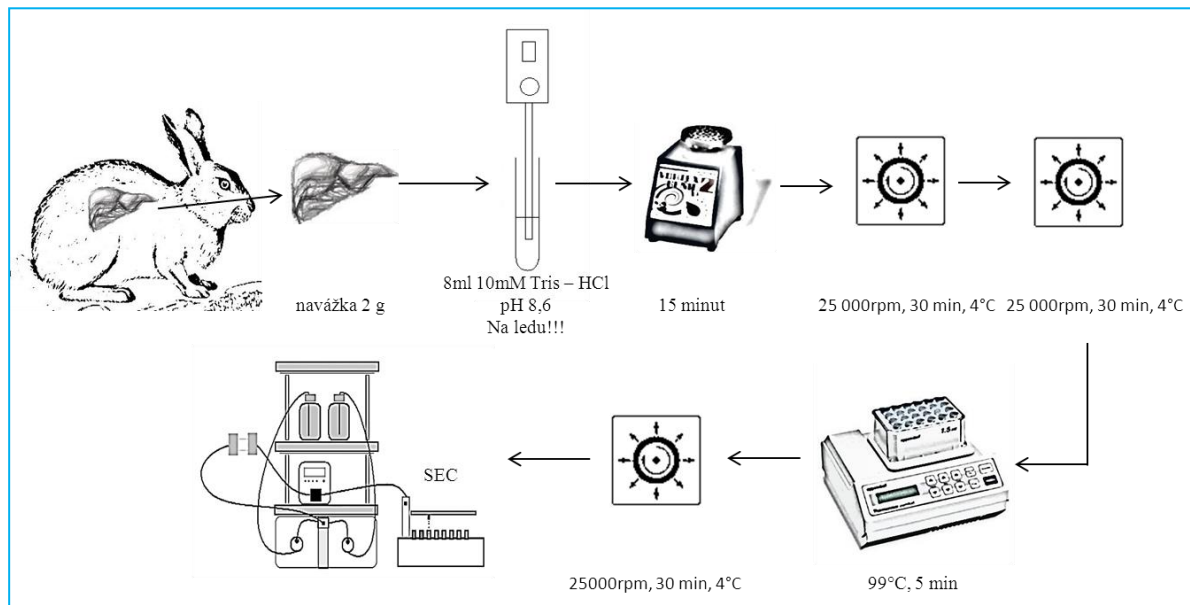
## VZOREK:

- nesmí být degradovaný, plesnivý, zkažený či jinak poškozený



# ☐ záleží na tom, co chceme dělat

## 1) METHALOTIONEIN



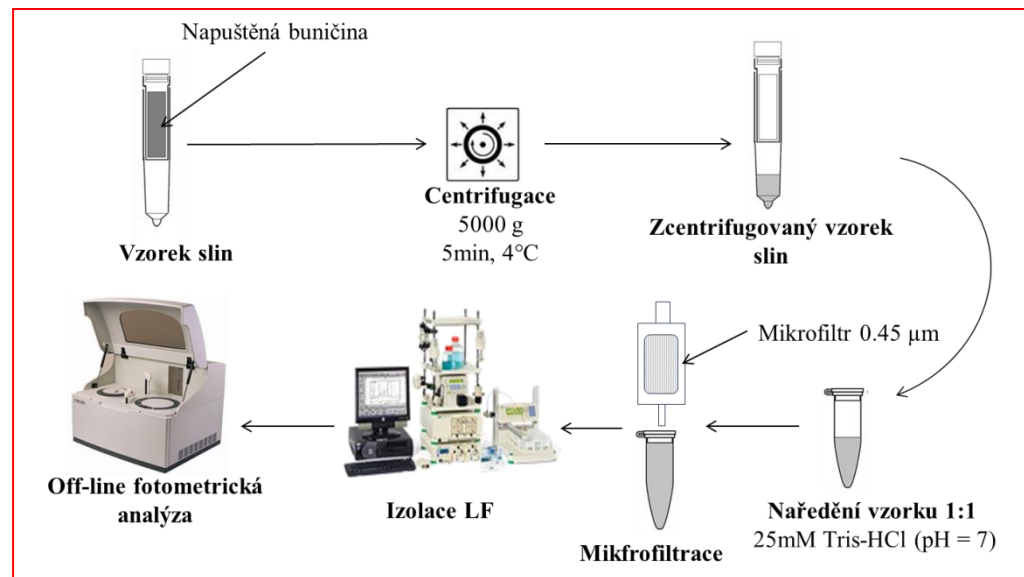
## 2) GFP



### 3) METHALOTIONEIN 3



### 4) LAKTOFERIN



### 5) MAXIMIN H5 + 6 bodových mutací??

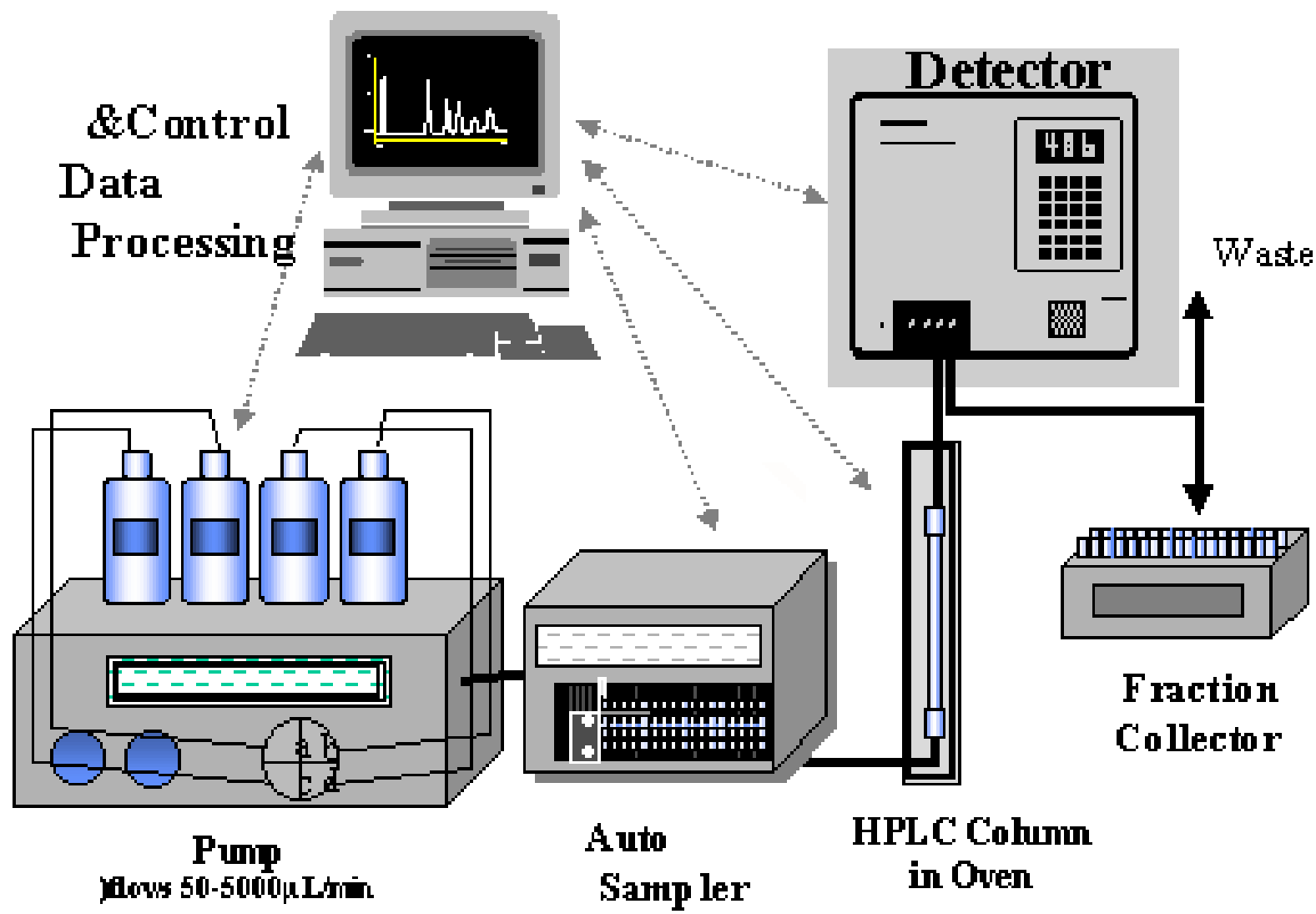
# SEPARACE



- ❑ rozdělení složek vzorku na základě jeho fyzikálních a chemických vlastností
- ❑ separace peptidů vyžaduje vysokou separační účinnost, protože jsou složité a mají vysoký počet komponent

# CHROMATOGRRAFIE

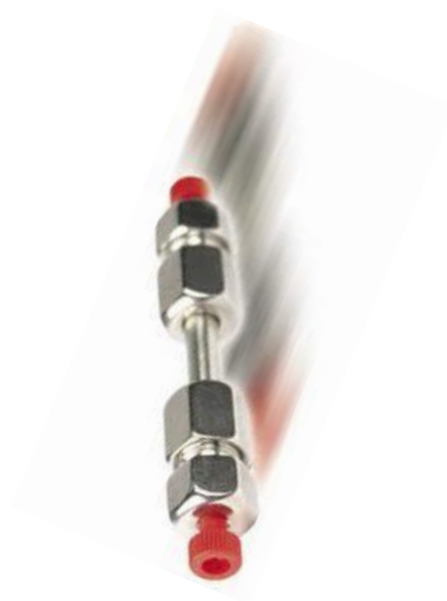
- ❑ založená na rozdílné pohyblivosti částic unášených mobilní fází při průchodu stacionární fází



# RP-HPLC

## CHROMATOGRRAFIE NA REVERZNÍCH (OBRÁCENÝCH) FÁZÍCH

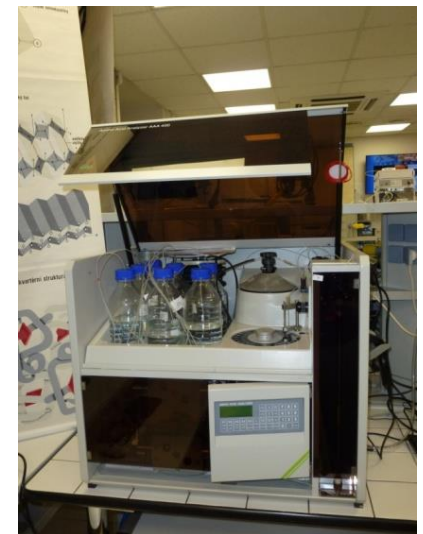
- ❑ interakce molekul solutu **podle jejich polarity** (hydrofobní interakce se stacionární fází)
- ❑ s klesající polaritou látek vzrůstá jejich retence (zadržení) v koloně
- ❑ polární mobilní fázi (směs vody a zředěných kyselin či zásad)
- ❑ nepolární stacionární fázi (silikagel-C řetězce), sorbent či oxidy kovu)
- ❑ separace peptidů, léčiv či biochemických sloučenin



# IEC

## IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRAFIE

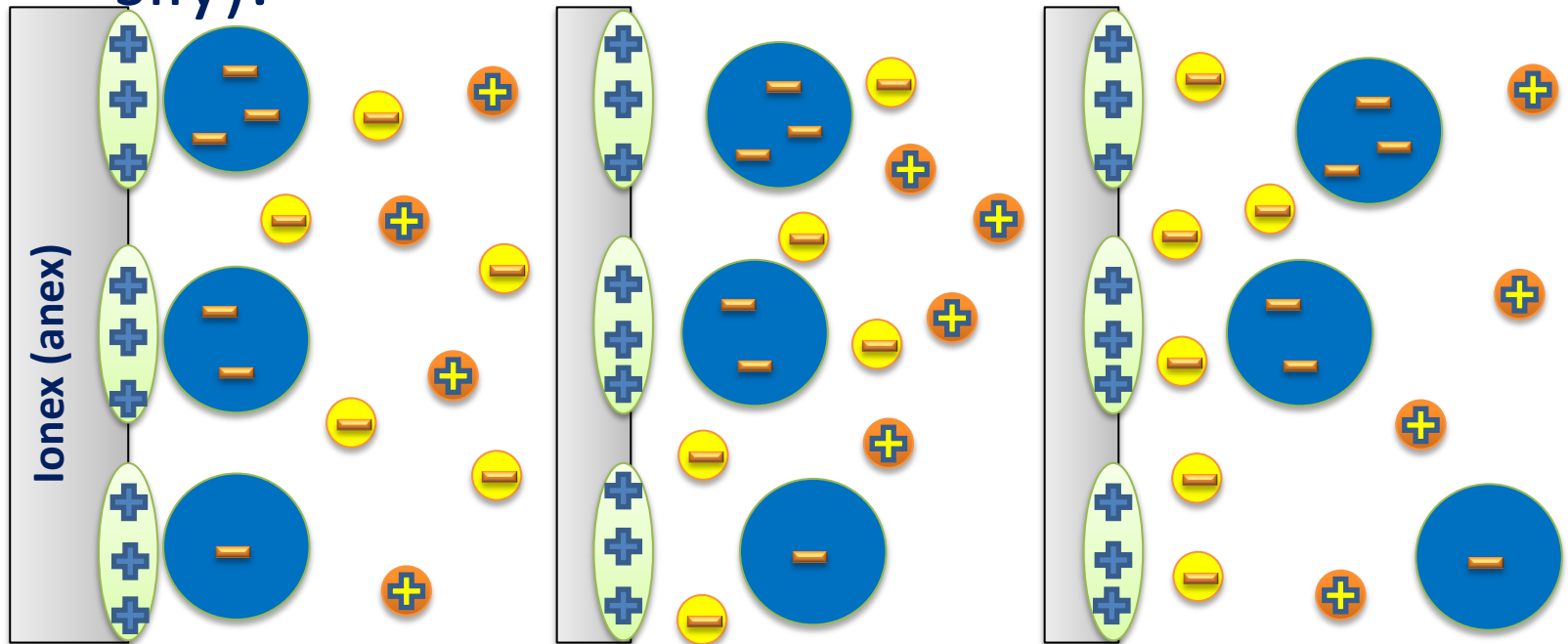
- ❑ výměna iontů mezi mobilní a stacionární fází **na základě rozdílných nábojů** (silné elektrostatické interakce-přitahování opačných nábojů)
- ❑ analyt v průběhu separace prostupuje směrem k měniči iontů, poté prochází měničem a dochází k vlastní výměně iontů
- ❑ **stacionární fáze** je tvořena ionexem (měnič ionů)
  - ↙ **anex-kladný náboj** (-NH<sub>2</sub>, -NHR, -NR<sub>2</sub>, -N<sup>+</sup>R<sub>3</sub>)
  - ↘ **katex-záporný náboj** (-OH, -COOH, -PO(OH)<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>H)
- ❑ **mobilní fáze**-vodné roztoky (vzorek či eluční činidlo)
- ❑ interakce iontu s ionexem **stoupá** s jeho **nábojem** (polaritou) a **klesá** s jeho **velikostí**
- ❑ chování aminokyselin, peptidů, bílkovin





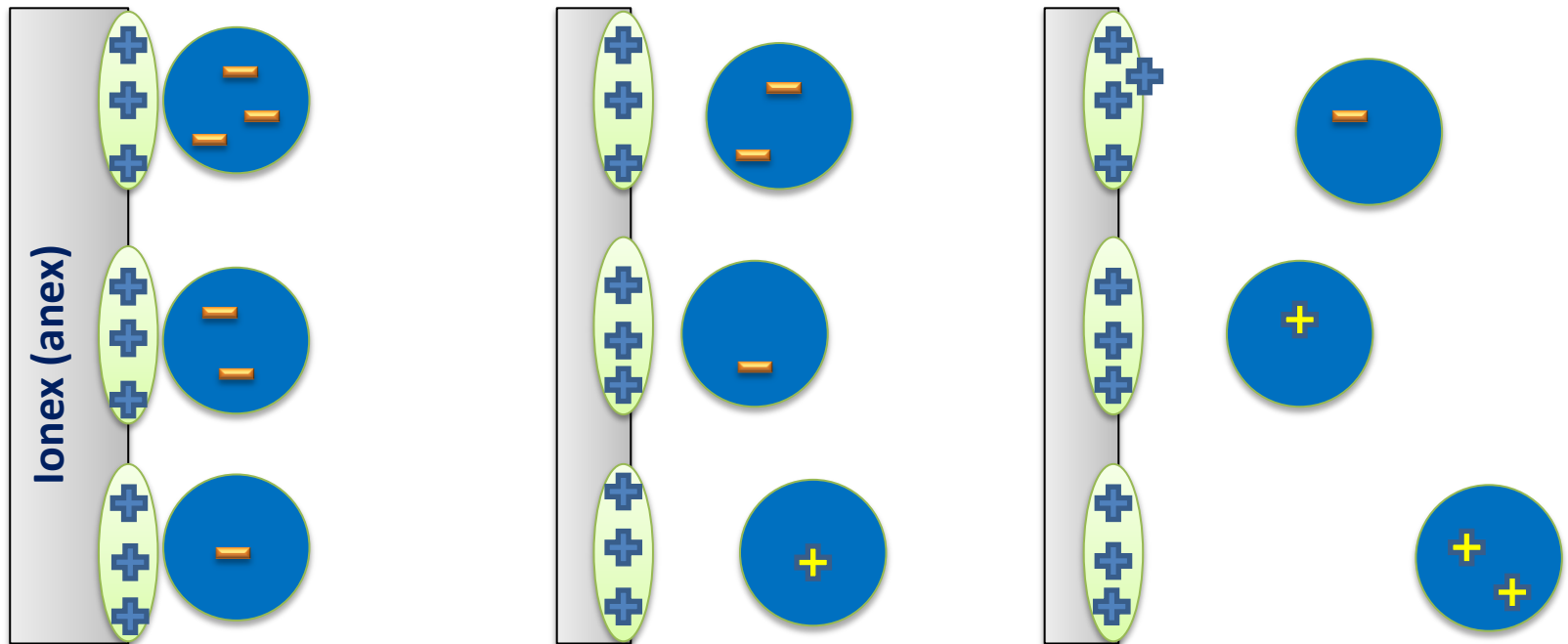
## Způsoby uvolňování iontů z kolony:

a) Eluce vytěsněním (gradientem iontové síly):

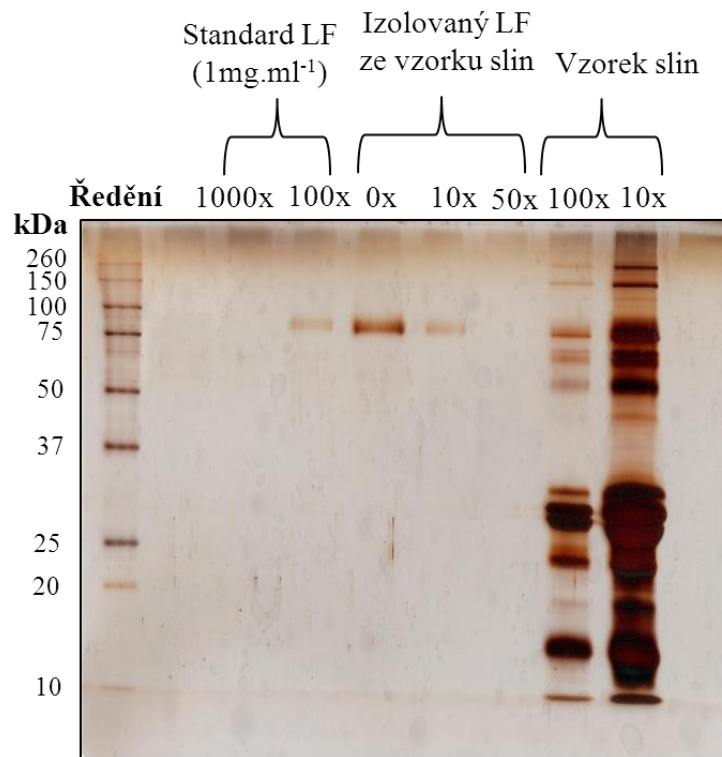
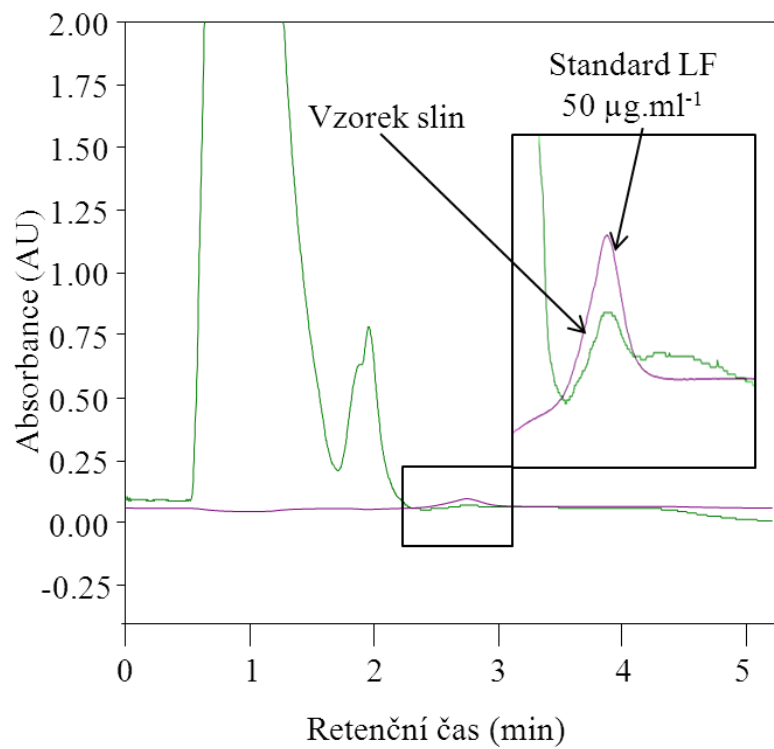


## Způsoby uvolňování iontů z kolony:

b) Eluce přenábojováním (gradientem pH):



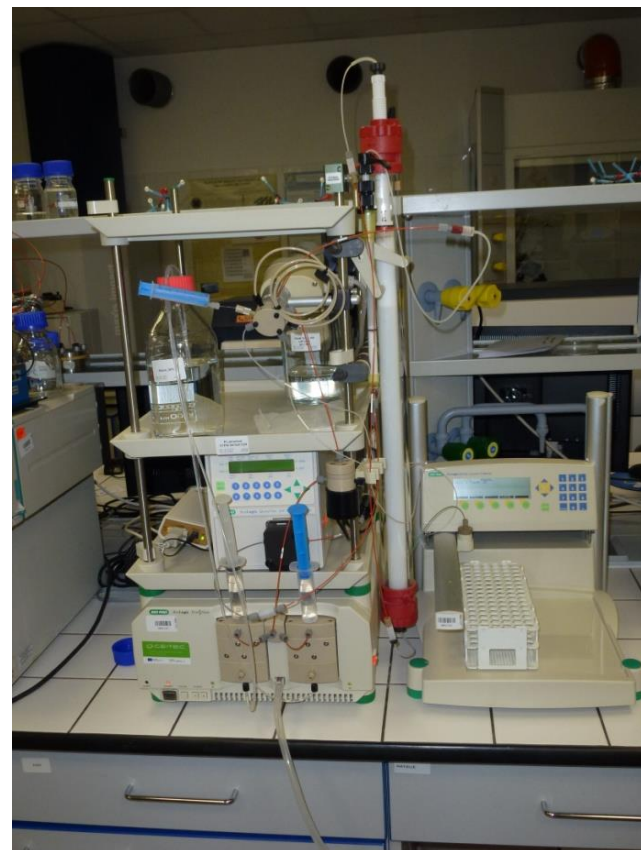
# LAKTOFERIN



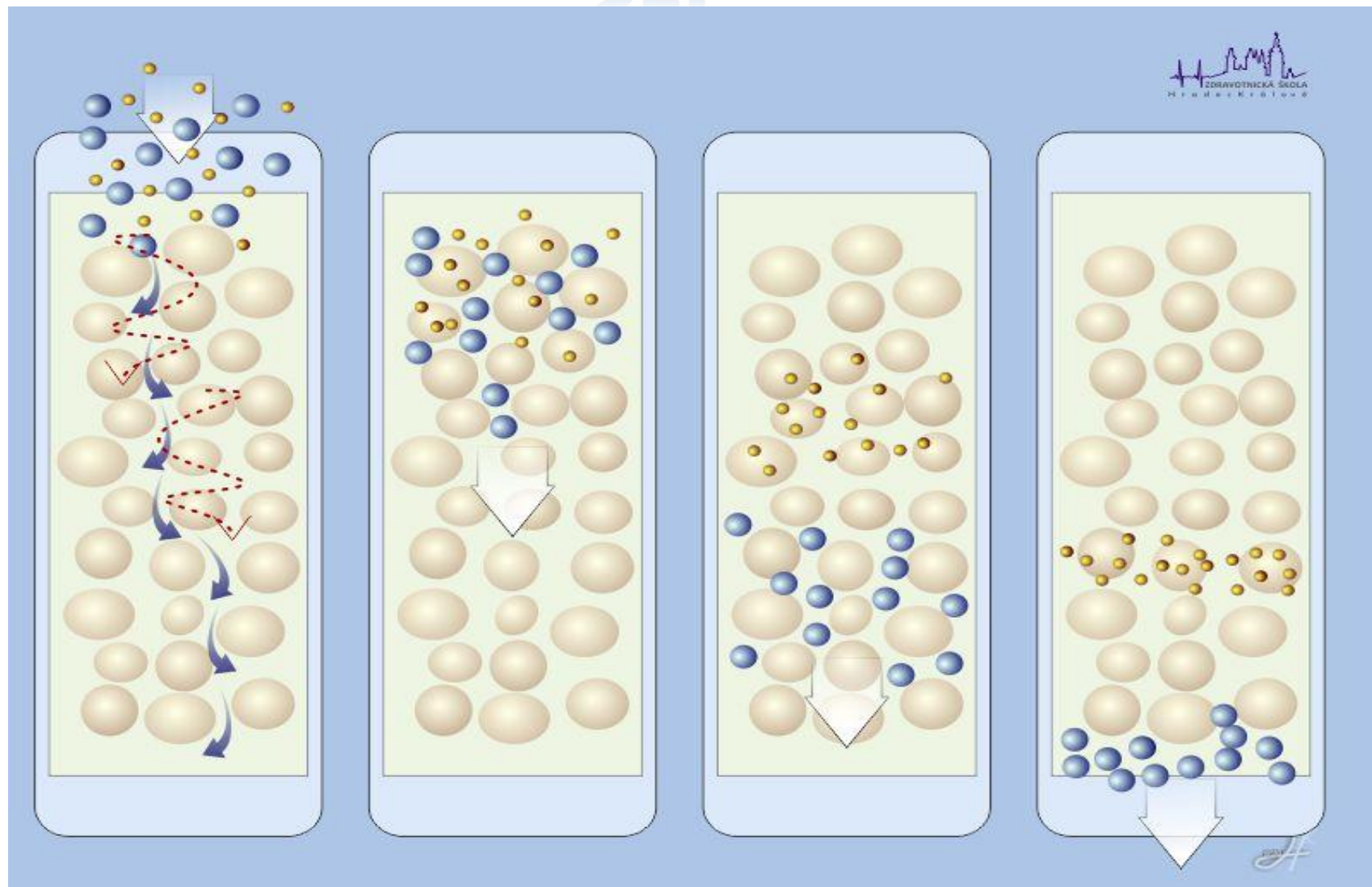
# SEC

## VYLUČOVACÍ (GELOVÁ) CHROMATOGRAFIE

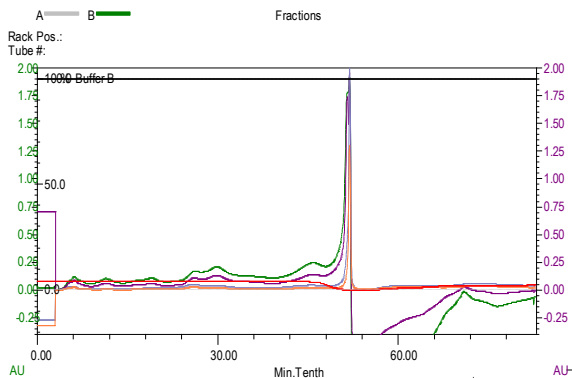
- ❑ rozdělování molekul **podle jejich velikosti a tvaru** ve svislé koloně, která je naplněna pórovitým polymerním gelem
- ❑ stacionární fáze-gel (složený z dextrinů zesítěných epichlorhydrinem)
- ❑ gel slouží jako molekulové síto-kolonou protéká konstantní rychlostí mobilní fáze stejného složení jako má roztok v pórech gelu a látky procházejí kolonou různou rychlostí
- ❑ dělení makromolekulárních látek, proteinů, enzymů, polysacharidů apod.



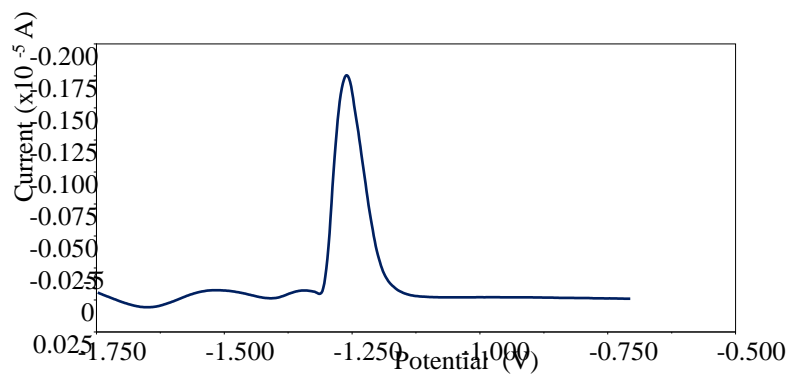
# SEC



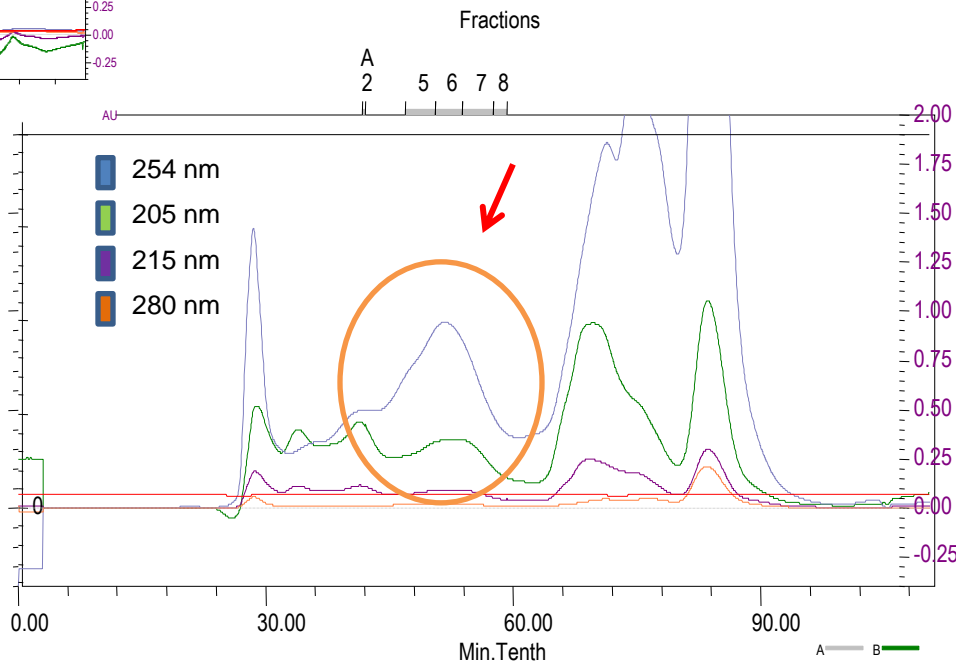
# MT: LEDVINY



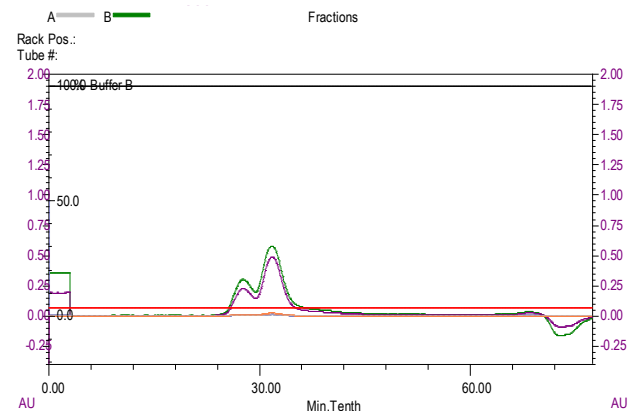
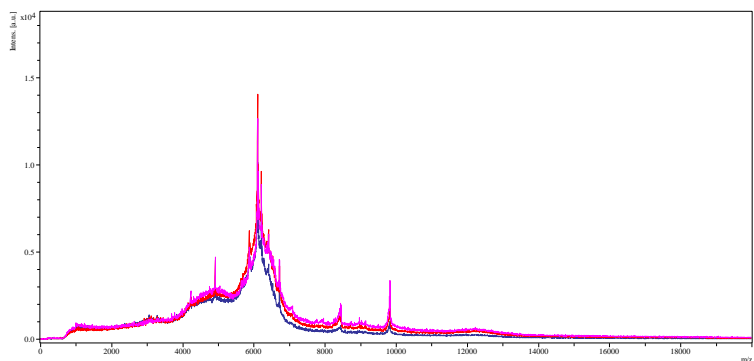
10 mM Tris+150 mM NaCl, pH 8,6



od 10  $\mu$ g/ml



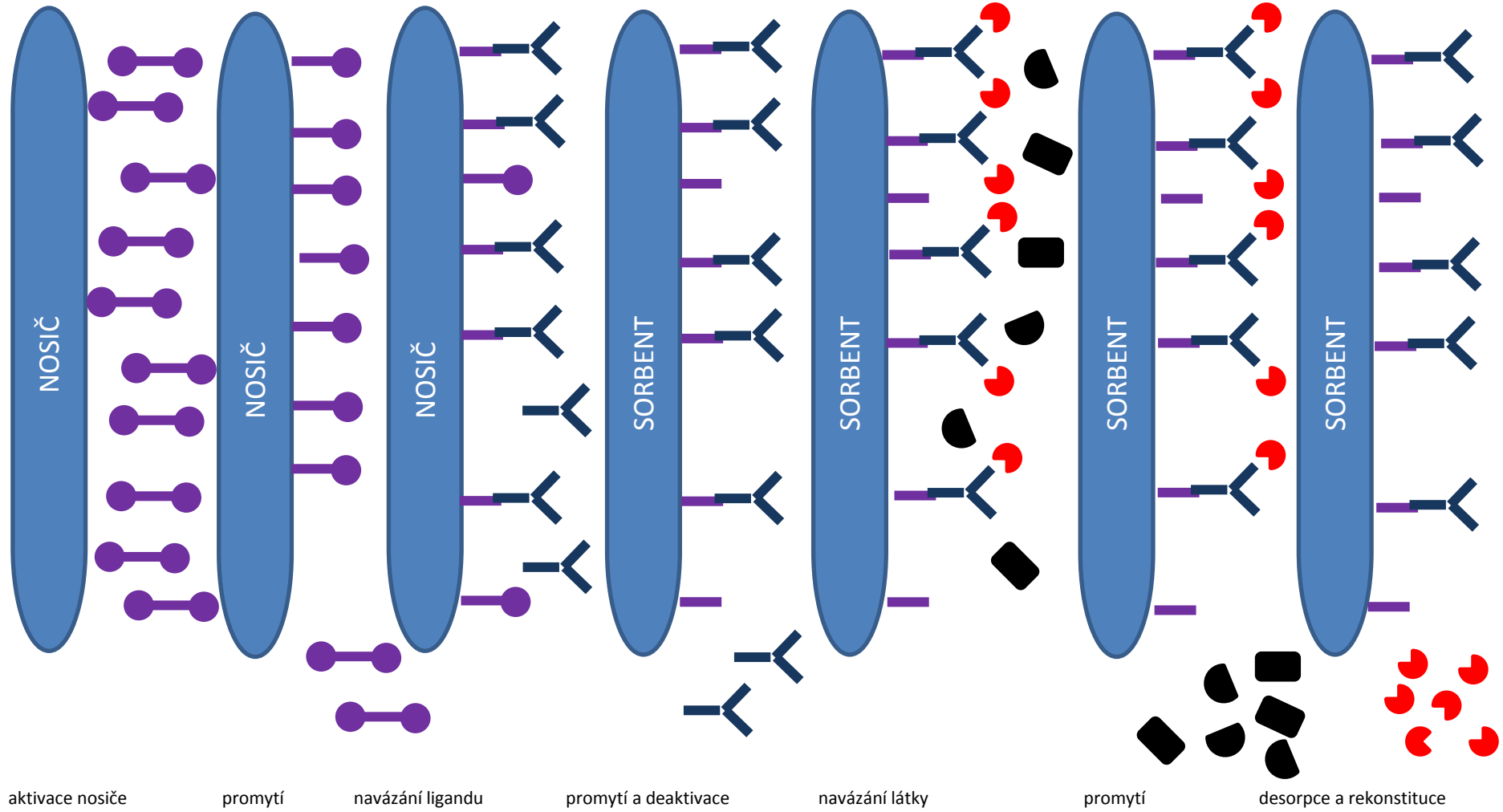
BSA (Albumin from bovine serum)  
1,5 mg/ml



# AC

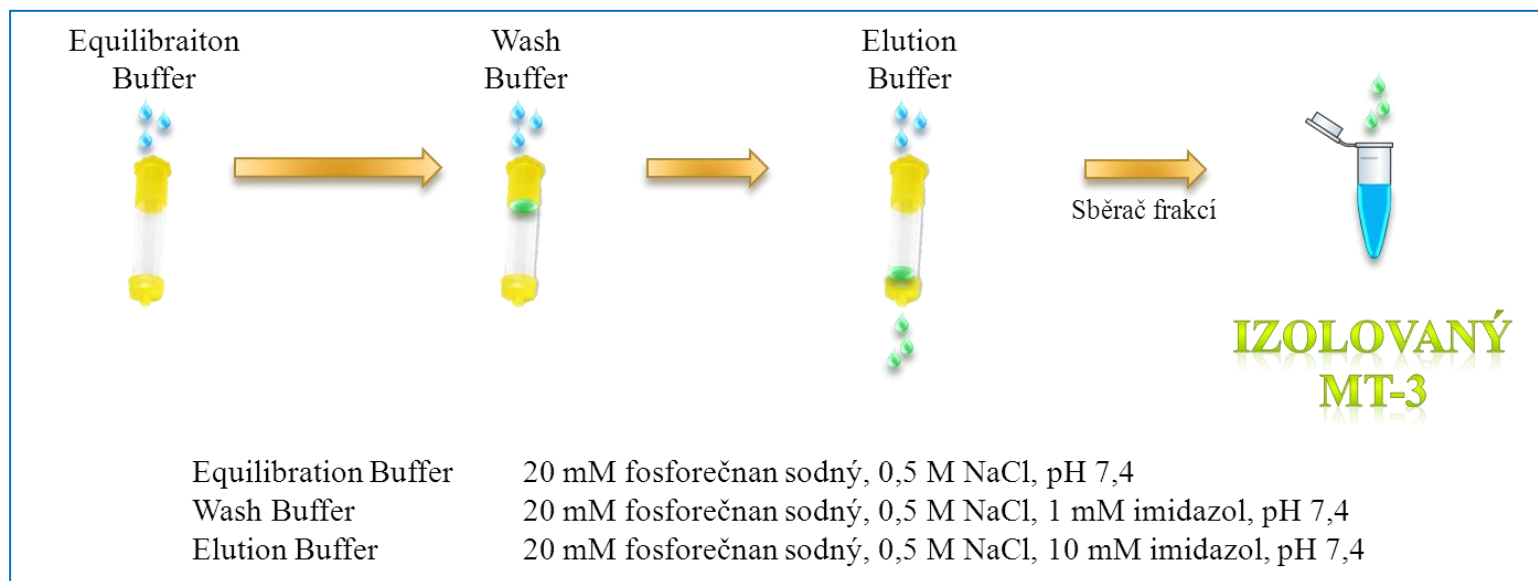
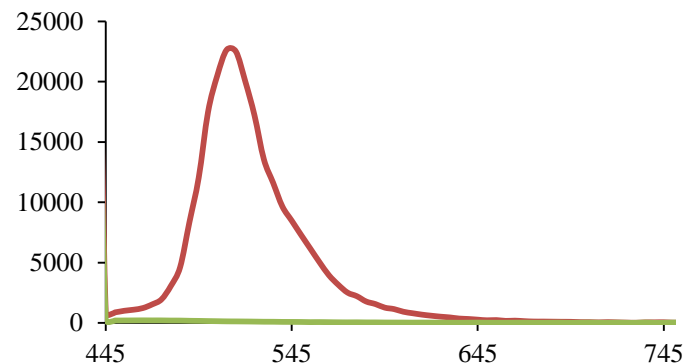
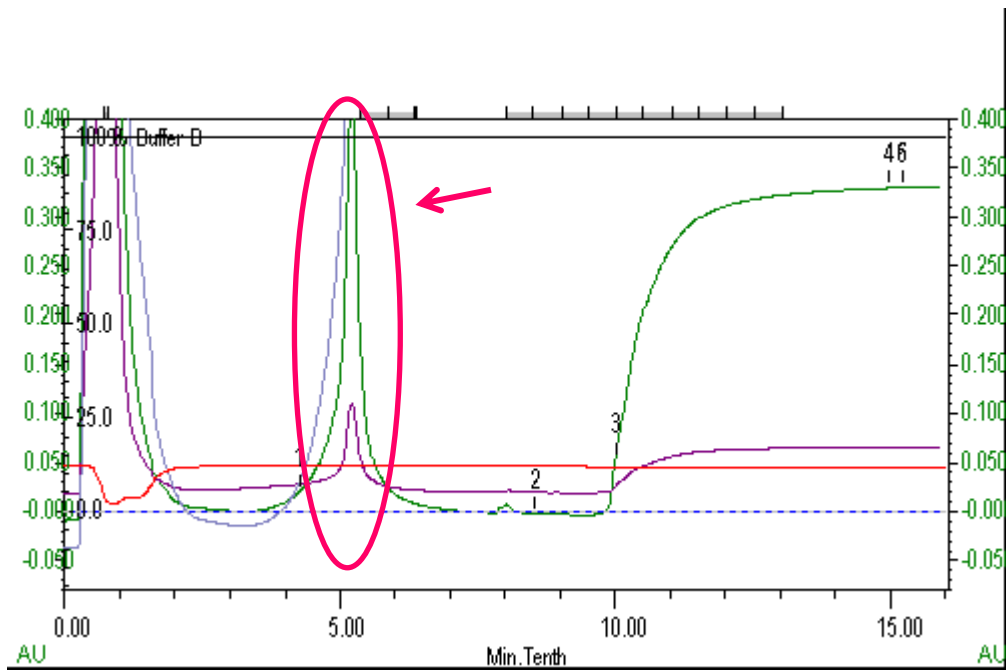
## AFINITNÍ CHROMATOGRAFIE

- ❑ specifické interakce vhodných partnerů:
  - enzym - inhibitor, substrát
  - protilátka - antigen
  - receptor - hormon
- ❑ **stacionární fáze** je tvořena nosičem (agarosa), na který je chemicky navázán jeden z partnerů
- ❑ **mobilní fáze**
  - navazovací pufr
  - promývací pufr
  - eluční činidlo
- ❑ separace bioaktivních látek, oddělení proteinu z komplexní směsi
- ❑ aplikace v lékařství a proteomice, analýza látek





# MT-3

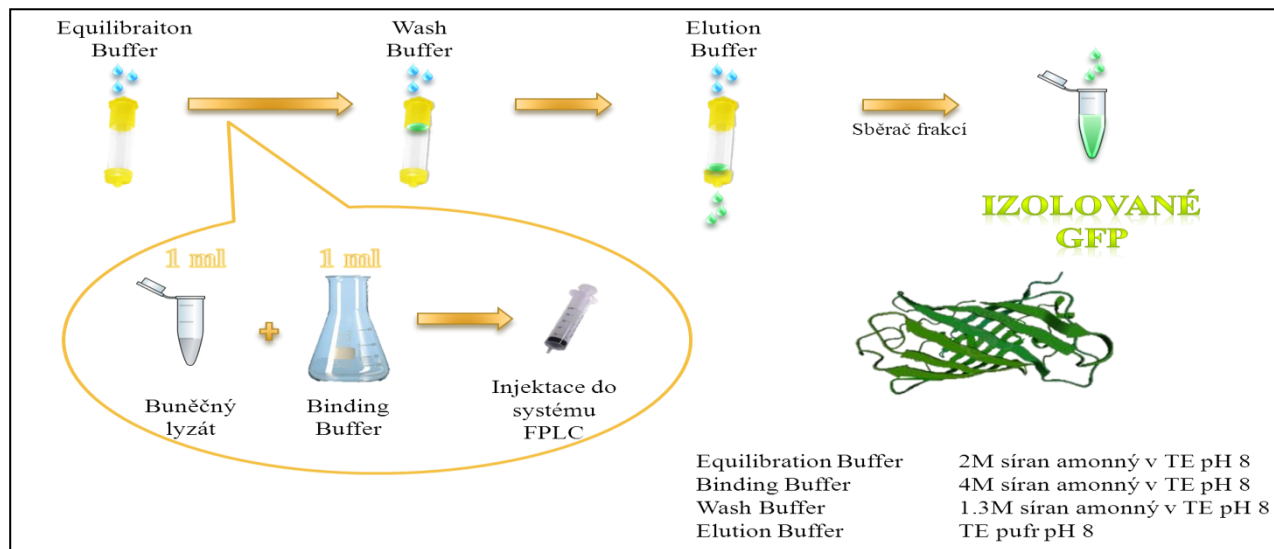
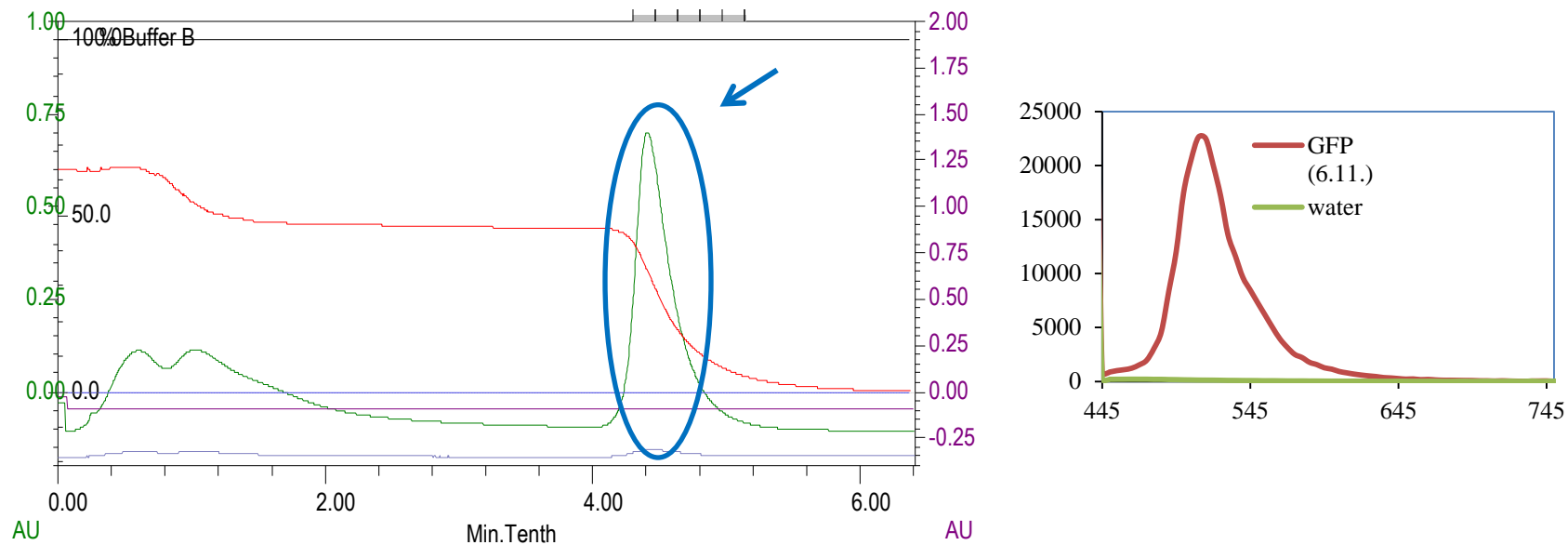


# HIC

## HYDROFÓBNÍ INTERAKČNÍ CHROMATOGRFIE

- gradientová eluce se snižující se iontovou silou mobilní fáze
- retence solutů je ovlivňována přidavkem organických nebo anorganických solí do vody
- stacionární fáze
  -  A. homogenní povrch (silikagel)
  -  B. nízký obsah hydrofobních skupin (propyl, butyl)
- na selektivitu separace má vliv:
  - stacionární fáze
  - typ soli (síran amonný, chlorid sodný, síran sodný)
  - teplota
  - pH
  - mobilní fáze
- zvýšení koncentrace soli v mobilní fázi → přechod solutu do stacionární fáze → zvýšení retence
- separace proteinů a velkých peptidů

# GFP



# PODĚKOVÁNÍ



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

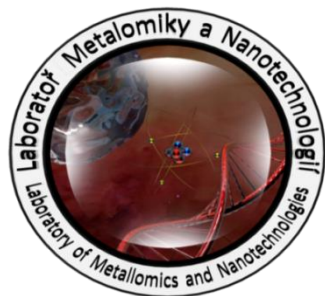


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Prof. Ing. René Kizek, Ph.D.  
Doc. RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.  
Mgr. Ondřej Zítka, Ph.D.  
Mgr. et Bc. Markéta Komínková

Mendel  
University  
in Brno



Celému týmu laboratoře metalomiky a nanotechnologií

Práce vznikla za podpory CZ.1.07/2.4.00/31.0023



# Děkuji Vám za pozornost



# LITERATURA

- 1) Future aspects in peptide chemistry: selected contributions presented at the Ringberg conferences. Editor Gunter Fischer, Wolfgang Voelter. Prague: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, 1999, viii, 243 s. Collection symposium series. ISBN 80-862-4103-3.
- 2) ZOUHAR, Jan. AFINITNÍ CHROMATOGRRAFIE PROTEINU NA VÁZANÝCH KOVOVÝCH IONTECH. *Chemické listy* 93. 1999, s. 683-685.
- 3) ŠIMAN, Pavel. *Chromatografie*. Ústav lékařské biochemie, 2013, s. 38.
- 4) NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0.
- 5) MOTYKA, Kamil a Jan HLAVÁČ. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- 6) LEHOTAY, Jozef a Slovenská technická UNIVERZITA. *Separace metody v analytické chemii*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2009. ISBN 978-802-2730-365.
- 7) Ing. Dr. Otakar, MIKEŠ, DrSc., *LABORATORNÍ CHROMATOGRAFICKÉ METODY*. Praha: SNTL, 1980, 676 s.
- 8) Doc. Ing. Milan POPL a DrSc. Ing. Jaroslav KUBÁT, CSc. *Separace látek*. Praha: SNTL, 1986, 172 s.
- 9) VAŇKOVÁ, Hana. PEPTIDOVÉ MAPY. *Chemické listy* 93. 1999, s. 120-127.
- 10) Mezinárodní norma. [online]. [cit. 2014-01-29]. Dostupné z:  
[http://web.vscht.cz/~koplkr/1\\_Odb%C4%9Br\\_vzork%C5%AF.pdf](http://web.vscht.cz/~koplkr/1_Odb%C4%9Br_vzork%C5%AF.pdf)